

**ЭФФЕКТЫ 24-ЭПИБРАССИНОЛИДА  
В КУЛЬТУРЕ OIDIODENDRON SP. IN VITRO**

*Н.Н. Ткачик, О.Г. Гришкевич, 4 курс  
Научные руководители – Н.Н. Чимбар, мл.н.с.,  
А.А. Волотович, к.б.н.  
Полесский государственный университет*

Род *Oidiodendron* относится к классу несовершенных грибов (FUNGIIMPERFECTI) или дейтеромицетов (DEUTEROMYCES), и наряду с аскомицетами и базидиомицетами представляют один из крупнейших классов грибов, объединяющий около 30% всех известных видов [1]. Этот класс представлен грибами с септированным мицелием, весь жизненный цикл которых обычно проходит в гаплоидной стадии, без смены ядерных фаз. Грибы размножаются только бесполом путем – конидиями, половые (совершенные) стадии у них отсутствуют. Конидии образуются на гаплоидном мицелии, на многоклеточных, реже одноклеточных конидиеносцах, представляющих ветви мицелия, обычно поднимающиеся над ним. Они могут быть малодифференцированными, не отличающимися от вегетативных гиф мицелия, но чаще хорошо развиты. Окраска конидий светлая или темная, буроватокоричневая, вследствие присутствия меланинов.

Грибы большинства видов рода *Oidiodendron* формируют экзо-, эндотрофную микоризу у растений семейства Ericaceae (Вересковые) [2–4].

Брассиностероиды являются перспективной группой гормонов. Брассиностероиды представляют класс специфических растительных стероидов с высокой рост-регулирующей активностью, обнаруживаемых в растениях в малых количествах [5, 6]. По химической природе – это производные оксистероидов с лактонной группой в кольце В. Брассиностероиды стимулируют различные физиологические изменения в растительных клетках, включающие изменение мембранного потенциала, ферментной активности, баланса эндогенных фитогормонов.

Ранее в 2010–2011 гг., на базе НИЛ клеточных технологий в растениеводстве (НИЛ КТР) УО «Полесский государственный университет» (ПолесГУ) были получены данные об успешном применении брассиностероидов для существенного увеличения стерильных, активно регенерирующих эксплантов *Vaccinium corymbosum* L. на этапах введения и стабилизации сортов в культуре *in vitro* (заявки о выдаче патента на изобретения № А20110076 от 20.01.2011 г. и № А20111446 от 31.10.2011 г.).

В настоящей статье приведены результаты исследований эффектов 24-эпибрассинолида на рост мицелия грибов рода *Oidiodendron* в культуре *in vitro*.

Исследования проводили на базе НИЛ КТР ПолесГУ на протяжении периода ноябрь 2010 г. – июнь 2011 г. В качестве объекта исследований использовали штаммы двух видов *Oidiodendron* sp., выделенные из нестерильных эксплантов сортовой голубики высокой в 2009–2010 гг., на этапе введения растений в культуру *in vitro* при использовании питательной, агаризованной среды на микро-, макро-солевой основе и с органическими соединениями по WPM [7]. Чистую культуру штаммов получали на агаризованной среде Чапека, которую готовили по стандартной методике [8] следующим образом: в 0,5–0,8 л дистиллированной воды растворяли  $\text{NaNO}_3$  – 9 г;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1 г;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5 г;  $\text{KCl}$  – 0,5 г;  $\text{FeSO}_4$  – 0,01 г; сахарозу – 30 г. Доводили объем раствора дистиллированной водой до 1 л, а pH раствора до 7,0–7,3. Добавляли агар-агар из расчета 15 г/л. Стерилизацию среды осуществляли путем автоклавирования в паровом стерилизаторе LAC–5060S в течение 30 мин при 0,8 атм. После автоклавирования питательная среда стерильно разливалась по чашкам Петри (диаметром 10 см) из расчета по 20 мл среды на одну чашку.

Все дальнейшие эксперименты проводили с использованием только чистых культур штаммов *Oidiodendron* sp. на агаризованной среде Чапека. Варианты опыта – агаризованная среда Чапека с 24-эпибрассинолидом (ЭБ) в концентрациях 0,25 мг/л; 0,50 мг/л и 0,75 мг/л. В качестве контроля использовали среду Чапека без ЭБ. Количество повторностей (чашек Петри) в каждом варианте опыта и в контроле – 4. Эксперимент проводили в ноябре 2010 г. и повторяли дважды – в декабре 2010 г. и в мае–июне 2011 г.

Образцы мицелия (диаметром 3 мм) чистой культуры каждого штамма *Oidiodendron* sp. вырезали и помещали мицелием вниз, на поверхности питательной, агаризованной среды Чапека контрольных и экспериментальных чашек Петри. Затем чашки с размещенным мицелием штаммов *Oidiodendron* sp. термостатировали при  $t^\circ = +22 \pm 1^\circ\text{C}$ , измеряя площадь формирующегося мицелия при помощи миллиметровой бумаги (по ГОСТ 334–73) через каждые 2–3 дня.

Общий математический анализ и дисперсионный анализ данных проводили по стандартным методам вариационной статистики [9], с использованием программы статистического анализа данных AB–Stat v.1.0 [10].

Результаты дисперсионного анализа приведены в таблице.

Установлено высоко достоверное (при  $P < 0,01$ ) влияние всех исследуемых факторов – генотипа, времени года, возраста мицелия и концентрации ЭБ на изменчивость анализируемого признака. Установлено также достоверное (при  $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ ) совокупное влияние трех первых факторов в разных комбинациях, а также совокупное влияние концентрации ЭБ  $\times$  время года и концентрации ЭБ  $\times$  возраст мицелия на изменчивость площади мицелия. При этом более чем в 91% случаев доля влияния приходится на факторы генотип (27,3%), возраст мицелия (48,1%) и их совокупность генотип  $\times$  возраст мицелия (16,2%). Доля влияния концентрации ЭБ на изменчивость площади мицелия составляет менее 0,1%. Дополнительный анализ влияния концентрации ЭБ на изменчивость площади мицелия в процессе роста гриба, осуществляемый по каждому из трех экспериментов в отдельности, выявил достоверное при ( $P < 0,05$ ) влияние только в весенне–летнем эксперименте. В ноябре и в декабре значимого влияния исследуемых концентраций ЭБ на изменчивость анализируемого признака не установлено, что свидетельствует, в целом, о незначительном и чаще несущественном влиянии ЭБ на рост мицелия гриба.

Таблица – Четырехфакторный дисперсионный анализ изменчивости площади мицелия *Oidiodendron* sp. в культуре *in vitro*

Источник варьирования	<i>df</i>	Средний квадрат	Доля влияния фактора, %
Общее	575	1056229,000	100,000
Фактор А (генотип)	1	<b>165649200,000**</b>	27,275
Фактор В (время года, сезон)	2	<b>10041520,000**</b>	3,307
АхВ	2	<b>165966,400*</b>	0,055
Фактор С (возраст мицелия)	7	<b>41712200,000**</b>	48,077
АхС	7	<b>14065010,000**</b>	16,211
ВхС	14	<b>529497,600**</b>	1,221
АхВхС	14	<b>147808,800**</b>	0,341
Фактор D (концентрация ЭБ)	2	<b>252443,300**</b>	0,083
АхD	2	92486,220	0,030
ВхD	4	<b>106274,900*</b>	0,070
АхВхD	4	63601,980	0,042
СхD	14	<b>77386,390*</b>	0,178
АхСхD	14	24619,800	0,057
ВхСхD	28	35577,070	0,164
АхВхСхD	28	31494,890	0,145
Повторности	3	154765,400	0,076
Случайные отклонения	429	37773,490	2,668

Примечание – \* – значимо при  $P<0,05$ ; \*\* – значимо при  $P<0,01$

Сопоставляя результаты наших исследований по прямому влиянию исследуемых концентраций ЭБ на рост и развитие *Oidiodendron* sp. *in vitro* с эффектом существенного увеличения количества стерильных, активно регенерирующих эксплантов сортовой голубики высокой в присутствии тех же концентраций ЭБ в составе среды для инициации побегообразования, можно заключить то, что существует опосредованный механизм ингибирования роста и развития мицелия гриба, возможно через активацию синтеза растительными клетками защитных фитоалексинов и хитиназы.

#### Список использованных источников

1. Жизнь растений: в 6-ти томах / под редакцией А.Л. Тахтаджяна. – М.: Просвещение, 1974. – Т. 2. – С. 370–376.
2. Scagel, C.F. Frequency and intensity of root colonization by ericoid mycorrhizal fungi in nursery production of blueberry plants / C.F. Scagel, A. Wagner, P. Winiarski // Small fruits review. – 2005. – Vol. 4, № 4. – P. 95–112.
3. Scagel, C.F. Inoculation with ericoid mycorrhizal fungi alters root colonization and growth in nursery production of blueberry plants from tissue culture and cuttings / C.F. Scagel, A. Wagner, P. Winiarski // Small fruits review. – 2005. – Vol. 4, № 4. – P. 113–135.
4. Couture, M. *Oidiodendron griseum* Robak: an endophyte of ericoid mycorrhiza in *Vaccinium* spp. / M. Couture, J.A. Forlin, Y. Dalpe // New phytologist. – 1983. – Vol. 95. – P. 375–380.
5. Khripach, V.A., Zhabinskii V.N., de Groot A.E. Brassinosteroids – a New Class of Plant Hormones. – San Diego: Academic, 1999. – 456 p.
6. Hayat S., Ahmad A. Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone. – Berlin: Springer-Verlag, 2010. – 462 p.
7. Trigiano, R.N. Plant tissue culture concepts and laboratory exercises / R.N. Trigiano, D.J. Gray. – US/MA, CRC Press LLC., 1999–2000. – 454 p.
8. Литвинов, М.А. Методы изучения почвенных микроскопических грибов / М.А. Литвинов. – Л., 1969. – 121 с.
9. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 350 с.
10. Анощенко Б.Ю. Программы анализа и оптимизации селекционного процесса растений / Б.Ю. Анощенко // Генетика. – М.: Наука, 1994. – Т.30. – Приложение. – С. 8–9.